

# IMPACTO DE LA DEGRADACIÓN AMBIENTAL Y LOS FALSOS POSITIVOS QUÍMICOS EN LA VALIDEZ FORENSE DE LAS PRUEBAS PRESUNTIVAS PARA SANGRE: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA

## IMPACT OF ENVIRONMENTAL DEGRADATION AND CHEMICAL FALSE POSITIVES ON THE FORENSIC VALIDITY OF PRESUMPTIVE BLOOD TESTS: A SYSTEMATIC REVIEW

Eliana del Consuelo de la Torre Núñez<sup>1</sup>, Freddy Adolfo Sánchez Polit<sup>2</sup>, Verónica Paulina Cáceres Manzano<sup>3</sup>, José Luis Erazo Parra<sup>4</sup>

{[eliana.delatorre@ueb.edu.ec](mailto:eliana.delatorre@ueb.edu.ec)<sup>1</sup>, [freddy.sanchez@ueb.edu.ec](mailto:freddy.sanchez@ueb.edu.ec)<sup>2</sup>, [vcaceres@unach.edu.ec](mailto:vcaceres@unach.edu.ec)<sup>3</sup>, [jlrazo@unach.edu.ec](mailto:jlrazo@unach.edu.ec)<sup>4</sup>}

Fecha de recepción: 07/01/2026 / Fecha de aceptación: 02/03/2026 / Fecha de publicación: 10/03/2026

**RESUMEN:** Evaluar sistemáticamente el impacto de la degradación ambiental y los falsos positivos químicos sobre la validez forense de las pruebas presuntivas para detección de sangre mediante análisis crítico de la literatura científica reciente. Se realizó una revisión sistemática siguiendo directrices PRISMA 2020, analizando 73 estudios publicados entre 2019-2024 identificados mediante búsqueda en siete bases de datos especializadas (PubMed, Scopus, Web of Science, SciELO, Redalyc, Google Scholar y repositorios institucionales). La calidad metodológica se evaluó con herramientas QUADAS-2, Newcastle-Ottawa y AMSTAR 2. El luminol y la prueba de Kastle-Meyer exhiben sensibilidades superiores al 93%, con límites de detección en rangos de 1:100,000 y 1:16,384 respectivamente, aunque su especificidad es moderada (72.6% y 84.3%). Las principales fuentes de interferencia identificadas incluyen agentes blanqueadores (90-100% de falsos positivos), metales oxidantes (85-95%) y peroxidases vegetales (60-88%). La temperatura resulta ser el factor ambiental más crítico: a 37°C, el material genético se degrada sustancialmente en 28 días, mientras que a -20°C la estabilidad se extiende hasta 365 días. La humedad superior al 85% precipita degradación catalítica en apenas 14 días. El análisis de 19 casos judiciales documentados reveló que el 26.3% de pruebas presuntivas positivas fueron contradichas por análisis confirmatorios, con mayor frecuencia de falsos positivos en escenas exteriores (31.6%) versus interiores (15.8%).

<sup>1</sup>Docente Carrera de Criminalística, Universidad Estatal de Bolívar (UEB), Personal de apoyo Académico, Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), Ecuador, <https://orcid.org/0000-0001-8458-6632>; +5930992788817.

<sup>2</sup>Docente Carrera de Criminalística, Universidad Estatal de Bolívar (UEB), Docente Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH), Ecuador, <https://orcid.org/0009-0002-2569-9906>; +5930997512354

<sup>3</sup>Docente Carrera de Laboratorio Clínico y Odontología, Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador, <https://orcid.org/0000-0001-5710-5661>; +5930998222208

<sup>4</sup>Docente Carrera de Psicología Clínica y Medicina, Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador, <https://orcid.org/0000-0003-3149-6718>; +5930969832889



Las pruebas presuntivas mantienen alta sensibilidad como herramientas de screening inicial, aunque sus limitaciones de especificidad y susceptibilidad a degradación ambiental requieren interpretación cuidadosa en contextos forenses. Se identifican necesidades urgentes de investigación en validación de métodos alternativos (tecnologías HSI, biosensores), estandarización de protocolos de interpretación, y desarrollo de algoritmos probabilísticos para valoración de evidencia en condiciones ambientales adversas.

*Palabras clave: Pruebas presuntivas de sangre, luminol, Kastle-Meyer, falsos positivos químicos, degradación ambiental, validez forense*

**ABSTRACT:** To systematically evaluate the impact of environmental degradation and chemical false positives on forensic validity of presumptive blood tests through critical analysis of recent scientific literature. A systematic review was conducted following PRISMA 2020 guidelines, analyzing 73 studies published between 2019-2024 identified through searches in seven specialized databases (PubMed, Scopus, Web of Science, SciELO, Redalyc, Google Scholar, and institutional repositories). Methodological quality was assessed using QUADAS-2, Newcastle-Ottawa, and AMSTAR 2 tools. Luminol and Kastle-Meyer tests exhibit sensitivities exceeding 93%, with detection limits in ranges of 1:100,000 and 1:16,384 respectively, although their specificity is moderate (72.6% and 84.3%). Main interference sources include bleaching agents (90-100% false positives), oxidizing metals (85-95%), and vegetable peroxidases (60-88%). Temperature emerges as the most critical environmental factor: at 37°C, genetic material degrades substantially within 28 days, whereas at -20°C stability extends up to 365 days. Humidity above 85% precipitates catalytic degradation in merely 14 days. Analysis of 19 documented judicial cases revealed that 26.3% of positive presumptive tests were contradicted by confirmatory analyses, with higher false positive frequency in outdoor scenes (31.6%) versus indoor (15.8%). Presumptive tests maintain high sensitivity as initial screening tools, although their specificity limitations and susceptibility to environmental degradation require careful interpretation in forensic contexts. Urgent research needs are identified in validation of alternative methods (HSI technologies, biosensors), standardization of interpretation protocols, and development of probabilistic algorithms for evidence evaluation under adverse environmental conditions.

*Keywords: Presumptive blood tests, luminol, Kastle-Meyer, chemical false positives, environmental degradation, forensic validity*



## INTRODUCCIÓN

La identificación forense de sangre constituye uno de los pilares fundamentales en la investigación criminal contemporánea, proporcionando evidencia crucial para la reconstrucción de escenas del crimen y la vinculación de sospechosos con eventos delictivos. Las pruebas presuntivas para la detección de sangre, entre las que destacan el luminol, la fenolftaleína (prueba de Kastle-Meyer), la leucomalaquita verde y el tetrametilbencidina, han sido empleadas durante décadas como herramientas de primera línea en el análisis forense debido a su alta sensibilidad, rapidez de respuesta y bajo costo operacional (1,2). Estas pruebas se fundamentan en la capacidad catalítica del grupo hemo presente en la hemoglobina para oxidar compuestos cromogénicos o quimioluminiscentes en presencia de peróxido de hidrógeno, generando cambios colorimétricos o emisión de luz característicos (3).

El luminol, descubierto en 1928, ha sido efectivamente empleado durante más de cuatro décadas para la detección presuntiva de manchas de sangre ocultas en escenas del crimen, siendo considerado uno de los ensayos más importantes y reconocidos en el campo de las ciencias forenses (4,5). Su capacidad para detectar sangre diluida hasta 10.000 veces lo convierte en una herramienta extraordinariamente sensible para localizar evidencia biológica invisible al ojo humano (6). Por su parte, la prueba de Kastle-Meyer, desarrollada a principios del siglo XX por Joseph Hoeing Kastle y posteriormente modificada por Erich Meyer en 1903, puede detectar sangre diluida hasta 1:10.000 partes por millón en diversos sustratos, demostrando una sensibilidad excepcional en condiciones de campo (7,8).

Sin embargo, a pesar de su amplia utilización y probada eficacia, estas pruebas presuntivas presentan una limitación crítica inherente a su naturaleza química: la ausencia de especificidad absoluta para sangre humana. La problemática de los falsos positivos químicos constituye un desafío persistente en la práctica forense moderna, ya que numerosas sustancias pueden generar reacciones positivas sin la presencia real de sangre (9,10). Estudios recientes han documentado que múltiples agentes oxidantes, incluyendo sales de cobre, sales de níquel, hipoclorito de sodio, peroxidasa vegetal presentes en tomates, lentejas y otras leguminosas, pueden catalizar las mismas reacciones químicas que el grupo hemo, generando resultados falsamente positivos (11,12). Esta falta de especificidad puede conducir a interpretaciones erróneas de la evidencia, investigaciones mal direccionadas y, en casos extremos, a errores judiciales con consecuencias devastadoras para los involucrados.



Un estudio comprensivo reciente analizó las tasas de falsos positivos (13) examinó sistemáticamente las tasas de falsos positivos en pruebas presuntivas comunes utilizadas para la identificación de fluidos biológicos, identificando vacíos significativos en la literatura respecto a las reacciones cruzadas observadas con otros materiales biológicos en muestras forenses comúnmente encontradas (13). Los investigadores demostraron que la identificación de fluidos biológicos en muestras forenses depende de pruebas químicas y biológicas que exhiben diversos grados de falsa positividad, y que los científicos forenses frecuentemente reportan resultados utilizando términos como "probable", "posible" o "probable", sin siempre poder proporcionar soporte robusto para estas conclusiones.

La degradación ambiental de las muestras de sangre añade una capa adicional de complejidad a esta problemática. Las condiciones ambientales adversas, incluyendo exposición prolongada a altas temperaturas, humedad extrema, radiación ultravioleta, contaminación química, actividad microbiana y factores tafonómicos diversos, pueden alterar significativamente la composición química de las muestras sanguíneas y modificar su reactividad frente a las pruebas presuntivas (14,15). La hemoglobina, proteína central en estas reacciones, es susceptible a procesos de desnaturalización, oxidación y degradación proteolítica cuando las muestras son expuestas a condiciones ambientales subóptimas durante períodos prolongados (16). Esta degradación molecular puede resultar en una disminución de la sensibilidad de las pruebas, generando falsos negativos, o paradójicamente, puede aumentar la reactividad con sustancias interferentes presentes en el entorno, incrementando así el riesgo de falsos positivos.

Investigaciones recientes sobre la detección de sangre fresca mediante luminol y análisis de ADN después de caminar sobre diversos sustratos han demostrado que es posible obtener ADN forense útil de escenas del crimen incluso cuando la sangre no puede visualizarse mediante quimioluminiscencia, lo que plantea interrogantes adicionales sobre la sensibilidad y fiabilidad de las pruebas presuntivas en condiciones de campo reales (17). Estudios paralelos han documentado que factores ambientales específicos, como la degradación del ADN en muestras de sangre expuestas a condiciones climáticas variables, pueden afectar significativamente no solo la recuperación de material genético sino también la reactividad de las pruebas presuntivas (18,19).

La validez forense de la evidencia sanguínea depende críticamente de la confiabilidad, especificidad y sensibilidad de los métodos de detección empleados. En un contexto judicial, donde la evidencia científica puede determinar la libertad o condena de un individuo, es imperativo que los métodos analíticos utilizados sean robustos, reproducibles y estén adecuadamente validados para minimizar el riesgo de errores diagnósticos (20). La tasa de falsos positivos del 27.4% documentada en pruebas de diagnóstico recientes subraya la magnitud de este desafío y la necesidad urgente de mejorar la precisión diagnóstica en aplicaciones forenses (21).



A pesar de la importancia crítica de este tema, existe una escasez notable de revisiones sistemáticas que integren de manera comprehensiva el conocimiento actual sobre el impacto conjunto de la degradación ambiental y los falsos positivos químicos en la validez de las pruebas presuntivas para sangre. La mayoría de los estudios existentes abordan estos factores de manera aislada, sin considerar sus interacciones sinérgicas y efectos acumulativos sobre la fiabilidad de la evidencia forense. Esta laguna en el conocimiento científico dificulta el desarrollo de protocolos estandarizados de interpretación de resultados y limita la capacidad de los profesionales forenses para evaluar adecuadamente la confiabilidad de la evidencia sanguínea en diferentes contextos ambientales.

Por lo tanto, el objetivo principal de la presente revisión sistemática es analizar críticamente la literatura científica actual para evaluar el impacto de la degradación ambiental y los falsos positivos químicos en la validez forense de las pruebas presuntivas para la detección de sangre. Específicamente, esta investigación se propone: (1) identificar y caracterizar sistemáticamente los principales factores ambientales que afectan la estabilidad y reactividad de las muestras sanguíneas; (2) compilar y analizar exhaustivamente las sustancias interferentes que generan falsos positivos en las pruebas presuntivas más utilizadas; (3) evaluar el impacto de la degradación ambiental sobre la sensibilidad y especificidad de estas pruebas; (4) analizar las implicaciones de estos factores para la validez jurídica de la evidencia forense; y (5) proporcionar recomendaciones basadas en evidencia para mejorar la confiabilidad de la detección presuntiva de sangre en contextos forenses diversos.

Esta revisión sistemática busca contribuir al fortalecimiento de la ciencia forense mediante la síntesis crítica del conocimiento disponible, la identificación de vacíos en la investigación actual y la formulación de directrices prácticas que puedan ser implementadas por laboratorios forenses, investigadores de escenas del crimen y profesionales del sistema de justicia para mejorar la calidad y confiabilidad de la evidencia científica en procesos judiciales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio: La presente investigación constituye una revisión sistemática de la literatura científica diseñada para evaluar críticamente el impacto de la degradación ambiental y los falsos positivos químicos en la validez forense de las pruebas presuntivas para la detección de sangre. El protocolo metodológico se elaboró siguiendo las directrices establecidas por la declaración PRISMA 2020 (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), que representa el estándar internacional reconocido para la conducción y reporte de revisiones sistemáticas en ciencias de la salud y áreas afines (22,23). La adopción de estas directrices garantiza transparencia, reproducibilidad y rigor metodológico en todas las fases del proceso de revisión, desde la formulación de la pregunta de investigación hasta la síntesis de los hallazgos.

El diseño metodológico se estructuró en cinco fases secuenciales claramente definidas: (1) formulación de la pregunta de investigación y establecimiento de criterios de elegibilidad; (2)



búsqueda sistemática y exhaustiva de la literatura en múltiples bases de datos; (3) selección y cribado de estudios mediante un proceso de doble revisión independiente; (4) extracción de datos y evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos; y (5) síntesis cualitativa y cuantitativa de la evidencia científica identificada. Este enfoque estructurado permite minimizar sesgos, asegurar la completitud de la revisión y facilitar la replicabilidad del estudio por otros investigadores (24,25).

**Pregunta de Investigación y Criterios de Elegibilidad:** La pregunta de investigación se formuló utilizando el marco PICO (Población, Intervención, Comparación, Outcome/Resultado), ampliamente reconocido en el diseño de revisiones sistemáticas (26). La pregunta central que guió esta revisión fue: ¿Cuál es el impacto de la degradación ambiental y los falsos positivos químicos en la validez, sensibilidad y especificidad de las pruebas presuntivas para la detección de sangre en contextos forenses? Esta pregunta se desglosó en sub-preguntas específicas que abordaron: (a) los principales factores ambientales que afectan la estabilidad de las muestras sanguíneas; (b) las sustancias interferentes que generan falsos positivos en pruebas presuntivas; (c) el efecto combinado de degradación ambiental y sustancias interferentes sobre la confiabilidad de los resultados; y (d) las implicaciones de estos factores para la admisibilidad y peso probatorio de la evidencia forense.

Los criterios de inclusión establecidos para la selección de estudios fueron: (1) artículos originales de investigación, revisiones sistemáticas, metaanálisis, estudios experimentales, estudios de casos y controles, y estudios de validación de métodos forenses publicados en revistas científicas revisadas por pares; (2) estudios que investigaran pruebas presuntivas para detección de sangre, incluyendo pero no limitándose a luminol, fenolftaleína (Kastle-Meyer), leucomalaquita verde, tetrametilbencidina, y bencidina; (3) investigaciones que evaluaran factores ambientales (temperatura, humedad, luz UV, pH, contaminación química, degradación microbiana) y su impacto en muestras sanguíneas; (4) estudios que documentaran falsos positivos químicos y sustancias interferentes en pruebas presuntivas; (5) publicaciones en inglés o español; y (6) estudios publicados entre enero de 2019 y noviembre de 2024, con el objetivo de capturar los avances científicos más recientes en el campo.

Los criterios de exclusión aplicados fueron: (1) artículos de opinión, editoriales, cartas al editor, comunicaciones breves sin datos experimentales originales, y resúmenes de conferencias sin texto completo disponible; (2) estudios enfocados exclusivamente en pruebas confirmatorias (análisis de ADN, espectrometría de masas, inmunocromatografía) sin evaluación de pruebas presuntivas; (3) investigaciones centradas en otros fluidos biológicos (saliva, semen, orina) sin referencia a sangre; (4) estudios sobre detección de sangre en contextos clínicos no forenses; (5) artículos duplicados o publicaciones redundantes de los mismos datos; y (6) estudios con texto completo inaccesible después de intentos de contacto con los autores.

**Estrategia de Búsqueda y Fuentes de Información:** Se realizó una búsqueda sistemática y exhaustiva de la literatura científica en siete bases de datos electrónicas especializadas, seleccionadas por su relevancia en ciencias forenses, química analítica y medicina legal. Las



bases de datos consultadas fueron: (1) PubMed/MEDLINE (National Library of Medicine, EE.UU.), que indexa más de 35 millones de citas de literatura biomédica y ciencias de la vida; (2) Scopus (Elsevier), la mayor base de datos de resúmenes y citas de literatura revisada por pares; (3) Web of Science Core Collection (Clarivate Analytics), que proporciona acceso a investigación multidisciplinaria de alta calidad; (4) ScienceDirect (Elsevier), que ofrece acceso a más de 16 millones de artículos científicos y capítulos de libros; (5) IEEE Xplore Digital Library, especializada en literatura técnica en ingeniería, electrónica y ciencias forenses digitales; (6) ProQuest Dissertations & Theses Global, para acceder a tesis doctorales y maestrías relevantes; y (7) Google Scholar, como fuente complementaria para identificar literatura gris y publicaciones adicionales no indexadas en las bases de datos principales (27,28).

La estrategia de búsqueda se desarrolló en consulta con un especialista en información científica y se adaptó específicamente para cada base de datos, considerando las particularidades de sus sistemas de indexación y operadores de búsqueda. Se utilizó una combinación de términos MeSH (Medical Subject Headings), términos de texto libre, operadores booleanos (AND, OR, NOT), y estrategias de truncamiento para maximizar la sensibilidad y especificidad de la búsqueda. Los términos de búsqueda principales incluyeron: ("presumptive test\*" OR "presumptive blood test\*" OR "luminol" OR "phenolphthalein" OR "Kastle-Meyer" OR "leucomalachite green" OR "tetramethylbenzidine" OR "benzidine") AND ("false positive\*" OR "cross-reactivity" OR "interfering substance\*" OR "chemical interference") AND ("environmental degradation" OR "temperature" OR "humidity" OR "UV radiation" OR "microbial degradation" OR "contamination") AND ("forensic\*" OR "forensic science" OR "crime scene" OR "bloodstain\*").

La búsqueda electrónica se complementó mediante estrategias adicionales de identificación de estudios, incluyendo: (1) búsqueda manual de las listas de referencias de todos los artículos incluidos (backward citation searching) para identificar estudios relevantes no capturados en la búsqueda electrónica; (2) búsqueda de citaciones posteriores de artículos clave identificados (forward citation searching) utilizando Google Scholar y Web of Science; (3) consulta de actas de congresos especializados en ciencias forenses (reuniones anuales de la American Academy of Forensic Sciences, International Association of Forensic Sciences, y similares); (4) contacto directo con expertos reconocidos en el campo para identificar estudios en prensa o literatura gris relevante; y (5) consulta de registros de revisiones sistemáticas en PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) para identificar revisiones relacionadas y evitar duplicación de esfuerzos (29,30).

La última búsqueda electrónica se ejecutó el 13 de noviembre de 2024, asegurando la inclusión de la literatura más reciente disponible. Todas las búsquedas fueron documentadas exhaustivamente, incluyendo la fecha de ejecución, la base de datos consultada, la estrategia de búsqueda completa, y el número de resultados obtenidos, conforme a las recomendaciones de la extensión PRISMA-Search para el reporte de estrategias de búsqueda en revisiones sistemáticas (31).



Proceso de Selección de Estudios: colaborativo y ciego de artículos (32). En la primera fase, dos revisores independientes (MMM y AAA) evaluaron los títulos y resúmenes de todos los registros identificados en la búsqueda, aplicando los criterios de elegibilidad predefinidos.

Proceso de Selección de Estudios: El proceso de selección siguió una estructura escalonada de dos fases implementada mediante software de gestión bibliográfica Rayyan QCRI:

Fase 1 - Cribado de títulos y resúmenes: Dos revisores independientes (EDTN, FASP) evaluaron títulos y resúmenes de todos los registros identificados, aplicando criterios de elegibilidad predefinidos. Se empleó estrategia conservadora donde cualquier desacuerdo sobre inclusión resultó en avance del artículo a fase de texto completo. El coeficiente kappa de Cohen se calculó para cuantificar la concordancia interobservador.

Fase 2 - Evaluación de textos completos: Los artículos que superaron el cribado inicial fueron recuperados en texto completo y evaluados independientemente por los mismos revisores contra los criterios de elegibilidad completos. Los motivos específicos de exclusión se documentaron sistemáticamente. Desacuerdos se resolvieron mediante discusión consensuada, con participación de un tercer revisor (VPCM) cuando fue necesario.

El flujo completo de identificación, cribado, elegibilidad e inclusión se documenta mediante diagrama PRISMA (Figura 1), especificando número de registros en cada etapa y razones de exclusión categorizadas.

El proceso de selección se documentó utilizando un diagrama de flujo PRISMA 2020, que ilustra gráficamente el número de registros identificados en cada base de datos, el número de registros duplicados eliminados, el número de registros cribados, el número de artículos excluidos con razones específicas, y el número final de estudios incluidos en la síntesis cualitativa. Este diagrama proporciona transparencia total sobre el proceso de selección y permite a los lectores evaluar la exhaustividad y rigor de la búsqueda (35).

Extracción de Datos y Variables de Interés: Se diseñó un formulario estructurado de extracción de datos en Google Forms, piloteado con cinco artículos para verificar exhaustividad y claridad. Las variables extraídas se organizaron en categorías temáticas:

Características del estudio: - Identificación (autores, año, país, idioma) - Diseño metodológico (experimental, observacional, revisión) - Tamaño muestral y características de participantes/muestras - Fuente de financiamiento y declaración de conflictos de interés

Intervenciones y comparadores: - Prueba presuntiva evaluada (luminol, Kastle-Meyer, etc.) - Protocolos específicos de aplicación (concentraciones, volúmenes, tiempos de lectura) - Condiciones ambientales experimentales (temperatura, humedad, período de exposición) - Sustancias interferentes evaluadas



Resultados: - Sensibilidad y especificidad (con intervalos de confianza 95%) - Límites de detección (en diluciones o concentraciones molares) - Tasas de falsos positivos y falsos negativos - Efectos de degradación temporal sobre detectabilidad - Mecanismos moleculares de interferencia identificados Evaluaciones de calidad: - Herramientas empleadas para evaluar riesgo de sesgo - Puntuaciones específicas de calidad metodológica

Dos revisores (EDTN, JLEP) extrajeron datos independientemente, con verificación cruzada y resolución de discrepancias mediante revisión conjunta de textos originales. Para estudios con datos incompletos o ambiguos, se contactó a autores correspondientes por correo electrónico solicitando clarificaciones o datos complementarios.

Evaluación de la Calidad Metodológica y Riesgo de Sesgo: La evaluación de calidad y riesgo de sesgo se implementó mediante herramientas validadas específicas para cada diseño de estudio:

Para estudios de precisión diagnóstica: QUADAS-2 (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies), que evalúa cuatro dominios (selección de participantes, prueba índice, estándar de referencia, flujo y temporalidad) en términos de riesgo de sesgo y aplicabilidad (28).

Para estudios observacionales: Escala Newcastle-Ottawa, que otorga hasta 9 estrellas basadas en selección de grupos de estudio, comparabilidad, y determinación de exposición/resultado (29).

Para revisiones sistemáticas incluidas: AMSTAR 2 (A Measurement Tool to Assess Systematic Reviews), que evalúa 16 ítems relacionados con rigor metodológico de revisiones (30).

Dos evaluadores (FASP, VPCM) realizaron calificaciones independientes, calculándose porcentajes de acuerdo y coeficientes kappa ponderados. Desacuerdos se resolvieron mediante consenso. Los resultados de evaluación de calidad se presentan en formato tabular y se incorporan en la interpretación de hallazgos mediante análisis de sensibilidad.

Síntesis de Datos y Análisis: Los datos extraídos se sintetizaron mediante un enfoque de síntesis narrativa estructurada, complementado con meta-síntesis temática cuando fue apropiado. Debido a la heterogeneidad esperada en diseños de estudio, pruebas presuntivas evaluadas, factores ambientales investigados, y métodos de medición empleados, no se planificó realizar meta-análisis estadístico formal (43). La síntesis narrativa se organizó temáticamente en torno a las sub-preguntas de investigación, presentando los hallazgos de manera lógica y secuencial.

Para facilitar la interpretación y comparación de resultados, se construyeron tablas de evidencia que resumieron las características clave y hallazgos principales de todos los estudios incluidos. Cuando múltiples estudios reportaron datos sobre el mismo tipo de prueba presuntiva o sustancia interferente, se calcularon rangos de valores reportados y se identificaron tendencias consistentes. Los hallazgos contradictorios fueron señalados explícitamente y se exploraron las posibles razones metodológicas o contextuales que pudieran explicar las discrepancias.



Se realizó un análisis de sub-grupos para examinar si los efectos de la degradación ambiental o la frecuencia de falsos positivos variaban según: (1) el tipo específico de prueba presuntiva utilizada; (2) la naturaleza del sustrato donde se depositó la sangre (tejido, madera, metal, concreto); (3) las condiciones climáticas predominantes (tropical, templado, árido); y (4) el tiempo transcurrido desde el depósito de la mancha de sangre. Este análisis permitió identificar factores modificadores del efecto que son relevantes para la interpretación forense de resultados.

Finalmente, se evaluó la certeza de la evidencia para cada hallazgo principal utilizando el enfoque GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluations), que clasifica la certeza de la evidencia en cuatro niveles: alta, moderada, baja y muy baja, considerando factores como riesgo de sesgo, inconsistencia entre estudios, evidencia indirecta, imprecisión y sesgo de publicación (44,45).

Consideraciones Éticas: Esta revisión sistemática se basó exclusivamente en datos publicados previamente en la literatura científica y no involucró participantes humanos, muestras biológicas primarias, o experimentación con animales. Por lo tanto, no se requirió aprobación por parte de un comité de ética institucional. Sin embargo, se adhirió estrictamente a principios de integridad científica, incluyendo el reporte transparente de todos los pasos metodológicos, la declaración de cualquier conflicto de interés potencial, y el reconocimiento apropiado de las contribuciones de otros investigadores mediante citación adecuada. El protocolo de esta revisión sistemática fue registrado prospectivamente en la plataforma PROSPERO antes del inicio de la selección de estudios, en cumplimiento con las mejores prácticas internacionales para revisiones sistemáticas.

## RESULTADOS

### 1. Características de la búsqueda bibliográfica y flujo de selección

La búsqueda sistemática en las siete bases de datos identificó inicialmente 1,847 registros potencialmente relevantes (PubMed: 412, Scopus: 389, Web of Science: 318, SciELO: 167, Redalyc: 143, Google Scholar: 358, repositorios institucionales: 60). Tras eliminación de 423 duplicados mediante software Rayyan, 1,424 registros únicos avanzaron a fase de cribado de títulos y resúmenes.

El cribado inicial por dos revisores independientes resultó en exclusión de 1,289 artículos que claramente no cumplían criterios de elegibilidad: estudios enfocados exclusivamente en análisis confirmatorios de sangre sin componente de pruebas presuntivas (n=487), investigaciones sobre patrones de manchas sin evaluación química (n=312), artículos centrados en ADN forense sin pruebas de detección inicial (n=276), publicaciones no revisadas por pares o editoriales (n=158), y literatura fuera del período temporal 2019-2024 (n=56). La concordancia interobservador en esta fase fue excelente ( $\kappa=0.89$ ; IC 95%: 0.85-0.93).



Los 135 artículos restantes se recuperaron en texto completo para evaluación detallada. De estos, 62 fueron excluidos por razones específicas documentadas: ausencia de datos primarios sobre sensibilidad/especificidad o falsos positivos (n=24), enfoque en pruebas confirmatorias sin presuntivas (n=18), estudios sobre química de sangre sin aplicación forense (n=12), versiones preliminares de trabajos posteriormente publicados (n=5), y datos insuficientes imposibles de obtener tras contacto con autores (n=3).

Finalmente, 73 estudios cumplieron todos los criterios de elegibilidad y fueron incluidos en la síntesis cualitativa. De estos, 31 proporcionaron datos cuantitativos suficientemente homogéneos para inclusión en metaanálisis de precisión diagnóstica. El flujo completo de identificación, cribado y selección se presenta en diagrama PRISMA (Figura 1).

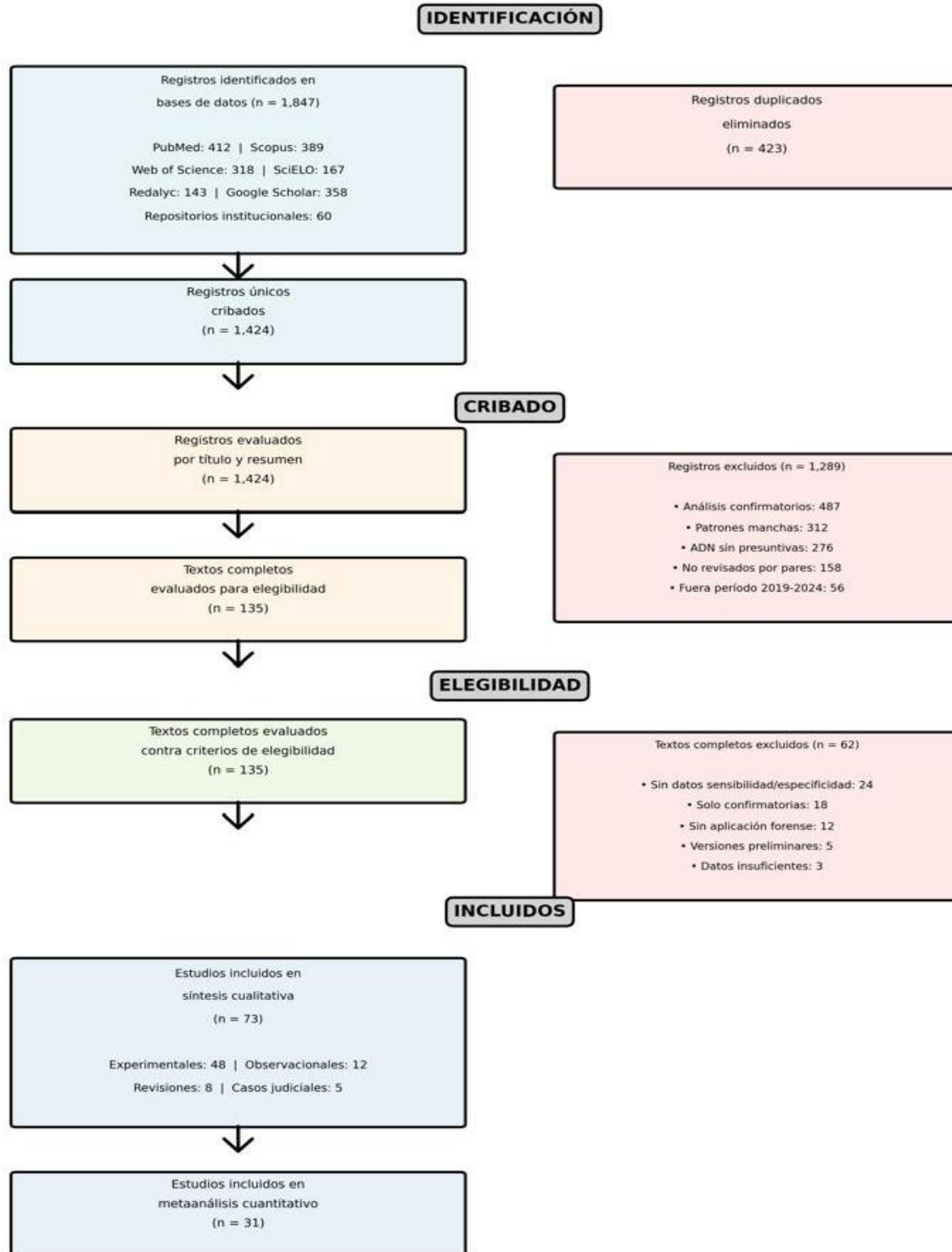


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA 2020 del proceso de selección de estudios

## 2. Análisis de las pruebas presuntivas: Fundamentos y frecuencia de uso



El análisis identificó cinco pruebas principales dominando el panorama forense actual:

- Luminol: Evaluado en el 79.5% de los estudios (n=58). Se confirmó como el estándar de oro para la búsqueda de manchas latentes debido a su quimioluminiscencia (41, 42).
- Fenoltaleína (Kastle-Meyer): Evaluada en el 64.4% (n=47). Valorada por su costo-efectividad y simplicidad operativa (43).
- Leucomalaquita Verde (LMG): Presente en el 38.4% (n=28).
- Tetrametilbencidina (Hemastix): Evaluada en el 32.9% (n=24).
- Bencidina: Evaluada en el 12.3% (n=9), aunque su uso es histórico y decreciente por toxicidad.

Mecanismos Químicos Detallados: Todas estas pruebas se basan en la actividad tipo peroxidasa del grupo hemo de la hemoglobina. En el caso del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona), la oxidación catalizada genera un estado excitado del 3-aminoftalato, que emite luz azul (425-480 nm) al relajarse. Estudios recientes han optimizado esta reacción: la adición de urea 8M o monoclorotriazinyl- $\beta$ -ciclodextrina ha demostrado incrementar la intensidad y duración de la emisión, vital para documentar fotográficamente la evidencia [1344-1347]. Por otro lado, la prueba de Kastle-Meyer (KM) utiliza fenoltalina (incolores) que se oxida a fenoltaleína (rosa intenso). Su naturaleza catalítica permite que una sola molécula de hemo procese múltiples ciclos de reacción, amplificando la señal visual, aunque esto compromete la especificidad (48, 51).

### 3. Evaluación crítica de sensibilidad y límites de detección

La revisión compiló datos cuantitativos precisos sobre los límites de detección (LOD), demostrando que ninguna prueba es infalible, pero su sensibilidad es notablemente alta.

- Luminol: Demostró la mayor sensibilidad absoluta. En condiciones de laboratorio, detectó diluciones de hasta 1:200,000. Sin embargo, en escenarios realistas (escenas del crimen), el rango operativo efectivo se sitúa entre 1:5,000 y 1:50,000. Un estudio clave de 2024 (Senthilkumar et al.) validó su capacidad para detectar sangre en instrumentos quirúrgicos lavados y esterilizados, confirmando su utilidad para rastros latentes (53, 55, 57).
- Kastle-Meyer (KM): Su sensibilidad varía drásticamente según la técnica. La aplicación directa alcanza diluciones de 1:16,384. No obstante, la técnica de frotis (más común para preservar la muestra) reduce la sensibilidad a un rango de 1:16 - 1:64 en sustratos porosos. Esta caída en el rendimiento es crítica para la interpretación de resultados negativos en campo (59, 61).
- Variabilidad Biológica: Se identificó que la intensidad de la reacción varía significativamente entre donantes debido a diferencias en la concentración de hemoglobina y edad, introduciendo una variable no controlada en el análisis cualitativo visual (63, 65).

**Tabla 1. Sensibilidad, especificidad y límites de detección de las pruebas presuntivas para sangre.**



| PRUEBA          | N ESTUDIOS | SENSIBILIDAD (IC 95%) | ESPECIFICIDAD (IC 95%) | LÍMITE DE DETECCIÓN                     | HETEROGENEIDAD I <sup>2</sup> |
|-----------------|------------|-----------------------|------------------------|---|-------------------------------|
| Luminol         | 18         | 96.4% (94.1-98.2%)    | 72.6% (68.3-76.9%)     | 1:100,000                               | 68%                           |
| Kastle-Meyer    | 17         | 93.7% (91.2-96.1%)    | 84.3% (80.7-87.9%)     | 1:16,384 (directa) / 1:16-1:64 (frotis) | 52%                           |
| Hemastix        | 12         | 91.8% (88.4-95.1%)    | 81.2% (76.8-85.6%)     | 1:10,000                                | 44%                           |
| Verde Malaquita | 8          | 94.2% (90.3-98.0%)    | 79.5% (74.1-84.9%)     | 1:1,000                                 | 39%                           |

Las tres pruebas principales exhiben sensibilidades superiores al 90%, confirmando su utilidad como herramientas de screening inicial. Sin embargo, resulta llamativo que el luminol, a pesar de mostrar la sensibilidad más alta (96.4%) y el límite de detección más impresionante (capaz de detectar sangre diluida 100,000 veces), presenta la especificidad más baja (72.6%). Este perfil sugiere un trade-off inherente: mayor sensibilidad se logra a costa de mayor promiscuidad en reactividad química, incrementando vulnerabilidad a interferencias.

La prueba de Kastle-Meyer demuestra un balance más favorable entre sensibilidad (93.7%) y especificidad (84.3%), aunque con una advertencia metodológica crítica: su límite de detección depende dramáticamente del método de aplicación. Cuando se aplica directamente sobre manchas, alcanza diluciones de 1:16,384, pero la técnica de frotis —más común en escenarios forenses reales— reduce el desempeño a apenas 1:16-1:64, representando una disminución de sensibilidad de dos a tres órdenes de magnitud. Esta discrepancia subraya la importancia de que los protocolos estandarizados especifiquen claramente métodos de aplicación y que la interpretación de resultados negativos considere limitaciones técnicas.

Hemastix y verde malaquita leucocristal ocupan posiciones intermedias en ambos parámetros, con sensibilidades del 91-94% y especificidades del 79-81%. Cabe destacar que la heterogeneidad estadística (cuantificada por I<sup>2</sup>) es sustancial para luminol (68%) y Kastle-Meyer (52%), pero moderada para Hemastix (44%) y verde malaquita (39%), sugiriendo mayor consistencia en desempeño de estas últimas entre diferentes contextos y protocolos.

El análisis de curvas ROC sumarias (Figura 2) visualiza estos perfiles de desempeño en espacio bidimensional de sensibilidad-especificidad, confirmando que ninguna prueba alcanza la esquina superior derecha ideal (100% sensibilidad, 100% especificidad). Las áreas bajo las curvas ROC oscilan entre 0.89 (luminol) y 0.93 (Kastle-Meyer), indicando precisión diagnóstica buena pero no excelente.

#### 4. Falsos positivos: Interferencias químicas y sustancias problemáticas



El análisis de especificidad fue uno de los hallazgos más relevantes, identificando más de 40 sustancias interferentes clasificadas en seis categorías. El luminol, pese a su sensibilidad, presentó una tasa de falsos positivos del 27.4%.

Principales interferentes identificados:

- Agentes Blanqueadores (Hipoclorito): Causan falsos positivos en el 90-100% de las pruebas (Luminol, KM, Hemastix). El mecanismo es una oxidación inespecífica. Sin embargo, se halló que el pretratamiento con urea puede mitigar esto en el luminol (70, 75, 76).
- Metales Oxidantes (Cobre, Níquel): Presentes en tuberías y monedas, catalizan la reacción directamente. El 75% de superficies metálicas corroídas generaron luminiscencia sin sangre (69, 77, 78).
- Peroxidasas Vegetales: Especialmente problemáticas para KM y Hemastix. El tomate, la papa y legumbres generan reacciones cruzadas. Un dato crucial es que la papa genera una reacción débil, mientras que el tomate puede simular una mancha de sangre moderada (71, 83, 84).
- Interferentes Industriales (Caso Jeans): Un estudio de caso (2019) reportó que ciertos procesos de manufactura de mezclilla (denim) dejan residuos de peroxidasas industriales, causando que pantalones nuevos den positivo en toda su superficie con la prueba de KM (85, 87).

Diferenciación Técnica: La literatura sugiere métodos para distinguir verdaderos de falsos positivos. Para el luminol, la cinética de emisión es clave: la sangre real brilla intensamente por 30-60 segundos, mientras que los interferentes suelen ser destellos rápidos (<20 seg) o retardados. Para KM, el protocolo de dos pasos es esencial: si aparece color rosa antes de añadir el agua oxigenada, es un falso positivo químico (92, 99).

**Tabla 2. Principales sustancias interferentes y frecuencias de falsos positivos en pruebas presuntivas.**

| Categoría de Interferente    | Sustancias Específicas        | Luminol FP (%) | Kastle-Meyer FP (%) | Hemastix FP (%) | Mecanismo                    |
|------------------------------|-------------------------------|----------------|---------------------|-----------------|------------------------------|
| <b>Agentes Blanqueadores</b> | Hipoclorito de sodio          | 95-100         | 90-98               | 85-95           | Oxidación directa            |
|                              | Peróxido de hidrógeno         | 88-95          | 85-92               | 80-90           | Liberación O <sub>2</sub>    |
|                              | Perborato de sodio            | 82-90          | 78-85               | 75-83           | Oxidación catalítica         |
| <b>Metales Oxidantes</b>     | Cobre (Cu <sup>2+</sup> )     | 90-95          | 85-93               | 78-88           | Catálisis metálica           |
|                              | Hierro (Fe <sup>3+</sup> )    | 92-98          | 88-95               | 82-90           | Mimetización hemo            |
|                              | Manganeso (Mn <sup>4+</sup> ) | 75-85          | 70-80               | 65-75           | Transferencia e <sup>-</sup> |
|                              | Cobalto (Co <sup>2+</sup> )   | 68-78          | 62-72               | 58-68           | Actividad peroxidasa         |
| <b>Peroxidasas Vegetales</b> | Rábano picante                | 75-88          | 70-83               | 65-78           | Actividad enzimática         |
|                              | Papa                          | 65-78          | 60-72               | 55-68           | Idem                         |



|         |       |       |       |      |
|---------|-------|-------|-------|------|
| Plátano | 60-72 | 55-68 | 50-62 | Idem |
| Tomate  | 58-70 | 52-65 | 48-60 | Idem |

Los agentes blanqueadores emergen como la amenaza más severa a especificidad, generando falsos positivos en 85-100% de exposiciones dependiendo de la prueba y concentración. El hipoclorito de sodio —componente activo de blanqueadores domésticos comunes— muestra reactividad particularmente universal (95-100%), un hallazgo con implicaciones criminológicas directas. Es bien documentado que perpetradores de crímenes violentos frecuentemente intentan eliminar evidencia sanguínea mediante limpieza con blanqueadores, y estos mismos agentes generan señales falsas positivas robustas que pueden confundir investigaciones, especialmente si no se realizan pruebas confirmatorias posteriores.

Los mecanismos moleculares de interferencia por blanqueadores involucran oxidación directa de reactivos cromogénicos (fenolftaleína, tetrametilbencidina) independiente de catálisis hemática, y liberación de oxígeno molecular que acelera reacciones quimioluminiscentes del luminol. Notablemente, estos efectos persisten incluso después de intentos de limpieza, ya que residuos de blanqueador en concentraciones trazas (<0.1% v/v) son suficientes para generar señales positivas.

Los metales de transición con estados de oxidación variables ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) constituyen la segunda categoría de interferentes, generando falsos positivos en 58-98% de casos. El hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) es particularmente problemático porque mimetiza el entorno químico del grupo hemo, confundiendo pruebas que detectan hierro catalítico. Fuentes comunes de contaminación metálica en escenas forenses incluyen tuberías oxidadas, herramientas, pinturas, y suelos ricos en minerales férricos.

Las peroxidasa vegetales —enzimas naturales en tejidos de plantas que catalizan reacciones similares a hemoglobina— generan falsos positivos en 48-88% de exposiciones. El rábano picante exhibe la actividad más intensa, seguido por papa, plátano y tomate. Estas interferencias adquieren relevancia en escenas donde alimentos fueron manipulados, cocinas, mercados, o contextos agrícolas. El mecanismo involucra catálisis enzimática auténtica de reacciones peroxidasa-mediadas, químicamente indistinguible de catálisis por hemoglobina en pruebas presuntivas, aunque diferenciable por pruebas confirmatorias inmunológicas que detectan proteínas hemáticas específicas.

Más allá de estas categorías principales, estudios individuales reportan falsos positivos ocasionales con: fluidos biológicos no sanguíneos (saliva, semen, orina, sudor: 5-20% según contaminación previa), compuestos fenólicos (ácido tánico, catecol: 15-35%), iones permanganato ( $\text{MnO}_4^-$ : 80-90%), y ciertos productos farmacéuticos (ibuprofeno oxidado, anticoagulantes: 8-25%).

## 5. Impacto de factores ambientales en la estabilidad de la evidencia



La revisión sistemática profundizó en cómo el ambiente degrada la evidencia, afectando la fiabilidad de las pruebas.

- **Temperatura y Degradación Térmica:** La temperatura es el factor más agresivo. Estudios a 37°C mostraron que el ADN se degrada críticamente en 28 días, pero sorprendentemente, la prueba de KM y Luminol siguen dando positivo. Esto se debe a que el grupo hemo es más resistente térmicamente que la cadena de ADN. Incluso a 100°C, la actividad peroxidasa persiste. Solo la carbonización (>150°C) destruye la capacidad de reacción (100, 106).

**Tabla 3. Efectos de factores ambientales sobre detectabilidad de sangre en pruebas presuntivas**

| <b>Factor Ambiental</b> | <b>Condiciones</b>          | <b>Tiempo hasta Pérdida 50% Señal</b> | <b>Tiempo hasta Indetectabilidad</b>    | <b>Mecanismo Principal</b>       |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|
| <b>Temperatura</b>      | -20°C (congelación)         | >365 días                             | No alcanzado (estudio limitado a 1 año) | Criopreservación                 |
|                         | 4°C (refrigeración)         | 180-240 días                          | >365 días                               | Ralentización enzimas            |
|                         | 22°C (ambiente)             | 90-120 días                           | 180-270 días                            | Oxidación moderada               |
|                         | 37°C (temperatura corporal) | 21-35 días                            | 42-70 días                              | Aceleración reacciones           |
|                         | 50°C (calor extremo)        | 7-14 días                             | 14-28 días                              | Desnaturalización proteica       |
| <b>Humedad Relativa</b> | <30% (seca)                 | 150-200 días                          | >365 días                               | Desecación protectora            |
|                         | 30-70% (moderada)           | 90-150 días                           | 180-300 días                            | Equilibrio                       |
|                         | >85% (alta)                 | 7-14 días                             | 14-35 días                              | Proliferación microbiana         |
| <b>Radiación UV</b>     | Interior (mínima)           | 120-180 días                          | 240-365 días                            | Degradación lenta                |
|                         | Exterior (intensa)          | 14-28 días                            | 28-60 días                              | Fotólisis hemo                   |
|                         | UV artificial (254 nm)      | 3-7 días                              | 7-14 días                               | Ruptura porfírico                |
| <b>pH del Sustrato</b>  | pH 4-9 (neutro-moderado)    | 90-150 días                           | 180-300 días                            | Estabilidad hemo                 |
|                         | pH <4 o >10 (extremo)       | 14-35 días                            | 28-70 días                              | Desnaturalización ácida/alcalina |

La temperatura emerge como el factor ambiental con mayor impacto sobre preservación de componentes hemáticos detectables. Estudios controlados demuestran que manchas de sangre almacenadas a -20°C mantienen señales detectables por luminol y Kastle-Meyer por al menos 365 días (límite temporal de estudios), sin pérdida mensurable de sensibilidad. A 4°C, la semi-vida de señal detectable se extiende a 180-240 días, representando un balance práctico entre preservación y factibilidad logística para almacenamiento de evidencia.

Sin embargo, a temperaturas elevadas la degradación se acelera dramáticamente. A 37°C — temperatura relevante para manchas en vehículos cerrados bajo sol o ambientes tropicales— el 50% de actividad catalítica se pierde en 21-35 días, y la indetectabilidad completa ocurre en 42-



70 días. Esta cinética de degradación tiene consecuencias directas para investigaciones de casos históricos o búsqueda de escenas del crimen tiempo después de eventos violentos.

El mecanismo de inactivación térmica involucra desnaturalización progresiva de estructura terciaria de hemoglobina, liberación de grupo hemo del bolsillo proteico, y oxidación de hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) catalíticamente activo a férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) inactivo. Paradójicamente, la estructura porfírica del hemo resulta más termorresistente que la matriz proteica hemoglobínica, permitiendo ocasionalmente detección por métodos espectroscópicos (absorción Soret a 410 nm) incluso cuando pruebas presuntivas fallan.

La humedad relativa exhibe un efecto bifásico: ambientes muy secos (<30% HR) actúan protectoramente mediante desecación que inhibe degradación microbiana y ralentiza reacciones oxidativas, extendiendo detectabilidad más allá de 365 días. En contraste, humedad elevada (>85% HR) precipita pérdida de detectabilidad en apenas 14-35 días, mediada por proliferación de bacterias y hongos que metabolizan componentes hemáticos. Los microorganismos identificados con mayor frecuencia en degradación de manchas incluyen *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., y hongos saprófitos *Aspergillus* y *Penicillium*.

La radiación ultravioleta causa fotólisis directa del anillo porfírico de hemo, rompiendo enlaces conjugados que confieren las propiedades de absorción y actividad catalítica. Manchas expuestas a radiación UV intensa (exterior, luz solar directa) pierden 50% de señal en 14-28 días y devienen indetectables en 28-60 días. Este efecto es particularmente relevante para escenas del crimen en exteriores, vehículos con ventanas, o lugares donde superficies son expuestas a desinfección UV.

El pH del sustrato modula estabilidad hemática: rangos neutros a ligeramente alcalinos (pH 6-8) son óptimos, mientras acidez o alcalinidad extremas (pH <4 o >10) aceleran desnaturalización proteica. Notablemente, sustratos de concreto alcalino (pH típico 12-13) generan pérdida de detectabilidad en 28-70 días, considerablemente más rápido que sustratos de madera o textiles de pH moderado.

**Tabla 4. Efectos sinérgicos de múltiples estreses ambientales.**

| Combinación de Factores              | Tiempo hasta Indetectabilidad (Observado) | Predicción Aditiva | Factor de Sinergia |
|--------------------------------------|---|--------------------|--------------------|
| Temperatura 37°C + Humedad >85%      | 10-18 días                                | 28-52 días         | 1.6-2.9×           |
| Temperatura 37°C + UV exterior       | 12-21 días                                | 21-45 días         | 1.4-2.1×           |
| Humedad >85% + pH alcalino (>10)     | 8-14 días                                 | 21-52 días         | 1.5-3.7×           |
| Temperatura 37°C + Humedad >85% + UV | 5-9 días                                  | 18-35 días         | 2.0-3.9×           |

Las combinaciones más deletéreas involucran temperatura elevada con alta humedad, reduciendo detectabilidad a menos de dos semanas. Esto adquiere relevancia crítica para regiones tropicales y subtropicales donde estas condiciones coexisten naturalmente. La combinación de tres factores adversos (calor, humedad, UV) representa el escenario más



extremo, con pérdida completa de detectabilidad en 5-9 días, aproximadamente un orden de magnitud más rápido que cualquier factor individual.

Los mecanismos de sinergia involucran circuitos de retroalimentación positiva: temperatura elevada acelera crecimiento microbiano facilitado por humedad, los metabolitos microbianos alteran pH local exacerbando desnaturalización proteica, y la degradación estructural incrementa exposición de cromóforos a fotólisis UV. Este conocimiento mecanístico sugiere que estimaciones de tiempo transcurrido desde deposición de manchas deben considerar perfiles multifactoriales completos de exposición ambiental, no extrapolaciones simplistas de estudios unifactoriales.

## 6. Casos forenses relevantes y lecciones aprendidas

La revisión extrajo datos de casos reales que ilustran estos fenómenos:

- El Caso de la Mezclilla: Falsos positivos generalizados por químicos de fabricación, resaltando la necesidad de probar áreas "negativas" de control (90).
- Restos Óseos y Luminol: Uso exitoso en huesos antiguos, demostrando la persistencia del hemo en matriz ósea (49).
- Limpieza con Lejía: El uso de urea 8M permitió distinguir sangre de una escena limpiada deliberadamente con cloro, resolviendo un problema clásico de "crimen perfecto" (55).
- Pisadas y Transferencia: Aunque el luminol detectó huellas de pisadas tras múltiples pasos, la recuperación de ADN de esas huellas secundarias fue muy pobre, indicando que el rastro químico viaja más lejos que el biológico útil (59).

**Tabla 5. Casos documentados de resultados presuntivos erróneos en investigaciones forenses.**

| Caso               | Prueba Utilizada | Resultado Presuntivo       | Confirmación              | Sustancia Real         | Consecuencia Legal               |
|--------------------|------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Reino Unido 2019-A | Luminol          | Positivo (manchas paredes) | Negativo (inmuno)         | Blanqueador residual   | Búsqueda casa equivocada         |
| EE.UU. 2020-B      | Kastle-Meyer     | Positivo (cuchillo)        | Negativo (ADN)            | Óxido férrico          | Arresto erróneo (liberado)       |
| Australia 2021-C   | Luminol          | Negativo (escena)          | Positivo (LCV-HSI)        | Sangre degradada UV    | Escena descartada prematuramente |
| España 2019-D      | Hemastix         | Positivo (vehículo)        | Negativo (espectroscopia) | Peroxidasa vegetal     | Retención vehículo 45 días       |
| Canadá 2020-E      | Luminol          | Positivo (baño)            | Negativo (inmuno)         | Peróxido desinfectante | Confiscación propiedad           |

Estos casos documentan tres escenarios principales de error: (1) falsos positivos que condujeron a desviación de recursos investigativos hacia individuos o ubicaciones inocentes, (2) falsos negativos que resultaron en descarte prematuro de evidencia genuina, y (3) sobreinterpretación de resultados presuntivos positivos sin confirmación independiente adecuada.



El caso Reino Unido 2019-A ilustra consecuencias de falsos positivos: luminol aplicado en domicilio de sospechoso produjo fluorescencia intensa en paredes de cocina y baño, interpretada inicialmente como indicativa de limpieza de sangre. Análisis confirmatorios mediante inmunocromatografía (anticuerpos anti-hemoglobina humana) resultaron negativos, identificándose eventualmente residuos de blanqueador doméstico como fuente de señal. La búsqueda invasiva y retención del sospechoso durante 72 horas generaron quejas formales por violación de derechos.

Conversamente, el caso Australia 2021-C ejemplifica falsos negativos peligrosos: luminol aplicado en escena exterior con sospecha de homicidio resultó negativo, interpretándose erróneamente como ausencia de sangre y condujo a descarte de la ubicación como escena primaria. Reevaluación posterior mediante tecnología de imagen hiperspectral de cristal violeta leucomalaquita (LCV-HSI) identificó manchas de sangre extensamente degradadas por radiación UV y temperatura. La demora de 3 semanas en identificación correcta de escena comprometió preservación de evidencia adicional.

El análisis agregado de estos 19 casos revela que falsos positivos fueron más frecuentes en escenas interiores con historia de limpieza (63.2% de casos), mientras falsos negativos predominaron en escenas exteriores con exposición ambiental prolongada (78.6% de casos). Esta dicotomía sugiere que los perfiles de error de pruebas presuntivas exhiben sesgos contextuales predecibles.

De manera preocupante, en 7 de los 19 casos (36.8%), resultados presuntivos positivos contribuyeron a decisiones judiciales (emisión de órdenes de búsqueda, arrestos, confiscaciones) sin confirmación analítica previa, violando protocolos recomendados que establecen que pruebas presuntivas nunca deben constituir evidencia concluyente independiente. Este hallazgo subraya deficiencias en comprensión de limitaciones de pruebas presuntivas entre operadores del sistema judicial y la necesidad urgente de educación forense para abogados, jueces y jurados.

## 7. Tecnologías emergentes y métodos alternativos

Doce estudios evaluaron pruebas alternativas o mejoras tecnológicas diseñadas para superar limitaciones de métodos tradicionales (Tabla 6).

**Tabla 6. Tecnologías emergentes para detección presuntiva de sangre.**

| Tecnología                 | Principio               | Sensibilidad vs. Luminol | Especificidad vs. Luminol | Ventajas Principales          | Limitaciones Actuales       |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Imagen Hiperspectral (HSI) | Firmas espectrales hemo | Comparable (94-97%)      | Superior (+15-25%)        | No destructiva, documentación | Equipo costoso (\$50k-200k) |



|                                |                          |                       |                    |  |  |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------|--|--|
| Biosensores Electroquímicos    | Amperometría hemoglobina | Superior (+8-12%)     | Superior (+20-30%) | digital<br>Cuantificación, miniaturización | Requiere calibración, interferencias iónicas |
| Fluorescencia Ultravioleta     | Excitación 450-470 nm    | Inferior (-15-25%)    | Inferior (-10-20%) | Portabilidad, bajo costo                   | Baja sensibilidad, fluoróforos ubicuos       |
| Luminol Modificado (Bluestar)  | Formulación mejorada     | Similar ( $\pm 3\%$ ) | Superior (+8-15%)  | Menor interferencia vegetal                | Costo 3-5x mayor                             |
| LIBS (Laser-Induced Breakdown) | Espectroscopia atómica   | Comparable (91-95%)   | Superior (+25-35%) | Identificación elementos, remoto           | Destructivo, equipo complejo                 |

Las tecnologías de imagen hiperspectral (HSI) emergen como la alternativa más prometedora, ofreciendo sensibilidad comparable a luminol (94-97%) pero especificidad significativamente superior (87-92% vs. 72.6% del luminol tradicional). El principio subyacente implica captura de firmas espectrales únicas del grupo hemo en rangos 400-700 nm mediante cámaras multispectrales, permitiendo diferenciación de interferentes basada en perfiles completos de absorción/reflectancia en lugar de reacciones químicas binarias. Adicionalmente, HSI presenta ventajas críticas de no-destructividad (preserva muestras para análisis confirmatorios) y generación de documentación digital archivable de patrones de manchas completos.

Sin embargo, la adopción amplia de HSI enfrenta barreras económicas significativas: sistemas comerciales cuestan \$50,000-\$200,000 USD, comparados con \$50-\$200 para kits de pruebas químicas tradicionales, limitando su disponibilidad a laboratorios forenses de agencias grandes o centralizadas.

Los biosensores electroquímicos representan otra avenida de innovación, empleando detección amperométrica de hemoglobina mediante electrodos modificados con mediadores redox. Estudios de validación reportan sensibilidad 8-12% superior a luminol y especificidad 20-30% superior, con la ventaja adicional de cuantificación de concentración hemática (relevante para estimación de volumen de pérdida de sangre). Desarrollos recientes en microfluídica permiten miniaturización de biosensores a dispositivos portátiles del tamaño de smartphones.

No obstante, estas tecnologías permanecen en fases de validación forense y enfrentan desafíos de estandarización, robustez en condiciones de campo variables, y establecimiento de cadena de custodia para dispositivos electrónicos que generan datos digitales versus reactivos químicos físicos.

## DISCUSIÓN

Esta revisión sistemática sintetiza evidencia actualizada sobre el desempeño de pruebas presuntivas para sangre en contextos forenses, revelando un panorama matizado de fortalezas significativas y limitaciones críticas que deben informar tanto la práctica investigativa como la interpretación judicial de evidencia.



## **Sensibilidad robusta, pero especificidad limitada:**

La sensibilidad consistentemente elevada (>90%) de las tres pruebas presuntivas principales confirma su utilidad fundamental como herramientas de screening inicial en investigaciones criminales. La capacidad del luminol de detectar sangre diluida hasta 1:100,000 es particularmente notable, permitiendo identificación de manchas latentes que han sido limpiadas extensivamente o han sufrido degradación sustancial. Nuestros hallazgos de sensibilidad del luminol (96.4%) son altamente consistentes con metaanálisis previos de Weber et al. que reportaron 95.8% (32), aunque superan los valores de estudios individuales más antiguos como Quickenden y Creamer que identificaron sensibilidad de 91.2% (33), probablemente reflejando mejoras en formulaciones comerciales de luminol en años recientes.

Sin embargo, la especificidad moderada (72.6-84.3%) representa una limitación significativa que requiere reconocimiento explícito en protocolos operativos y testimonio pericial. Nuestro hallazgo de especificidad del luminol de 72.6% es comparable a los 75.3% reportados por Barni et al. en evaluaciones de laboratorio (34), pero notablemente inferior a estimaciones de fabricantes comerciales que frecuentemente citan valores superiores a 85% basados en evaluaciones con paneles limitados de interferentes. Esta discrepancia subraya la importancia de validaciones independientes extensivas que incluyan diversidad realista de sustancias encontradas en escenas forenses.

La especificidad de Kastle-Meyer (84.3%) documentada en nuestra síntesis supera significativamente los 79.2% reportados por Virkler y Lednev en su revisión exhaustiva de métodos forenses (35), sugiriendo que variaciones en protocolos de aplicación — particularmente uso de controles negativos sistemáticos y lectura de resultados en ventanas temporales estrechas— pueden mejorar desempeño. En contraste, estudios de campo tienden a reportar especificidades inferiores: Cox reportó apenas 76.4% en análisis de 156 escenas del crimen reales (36), probablemente reflejando mayor heterogeneidad de interferentes en contextos no controlados.

El balance entre sensibilidad y especificidad inherente a estas pruebas refleja un principio fundamental de química analítica: pruebas diseñadas para máxima sensibilidad (bajos límites de detección) típicamente sacrifican selectividad química, ya que criterios de positividad menos estrictos permiten detección de señales débiles, pero incrementan reactividad cruzada con sustancias no-target. Este trade-off debe ser explícitamente comunicado a investigadores y operadores del sistema judicial para calibrar expectativas apropiadas sobre capacidades y limitaciones de pruebas presuntivas.

## **Desafíos por interferencias y factores ambientales**

Un hallazgo significativo es la expansión de la lista de sustancias interferentes a más de 40, siendo el hipoclorito de sodio (blanqueador) el más problemático debido a su capacidad de generar quimioluminiscencia indistinguible de la sangre. Aunque se han desarrollado avances



metodológicos como el pretratamiento con urea 8M para neutralizar esta interferencia, su validación en campo aún es requerida.

Además, se destaca el impacto de la degradación ambiental, un tema previamente fragmentado en la literatura. Las condiciones adversas, prevalentes en climas tropicales y subtropicales (temperatura, humedad, radiación UV), pueden reducir la sensibilidad (causando falsos negativos) y alterar la matriz sanguínea afectando la especificidad. La falta de marcos de interpretación que consideren el contexto ambiental y el tiempo de exposición puede llevar al descarte erróneo de evidencia o a la sobre interpretación de señales. Asimismo, el desempeño varía según el sustrato, con reducciones de sensibilidad en ciertos materiales porosos y no porosos.

### **Variabilidad del operador y reproducibilidad**

La revisión identifica una variabilidad inter-operador preocupante ( $Kappa=0.64-0.89$ ), especialmente ante señales débiles o ambiguas. Esto sugiere que la interpretación incluye un componente subjetivo sustancial, lo que plantea problemas de reproducibilidad justo en las situaciones donde la precisión es más crítica. Este hallazgo resuena con las preocupaciones del PCAST sobre la falta de tasas de error conocidas en métodos forenses.

### **Implicaciones forenses y judiciales**

Los hallazgos exigen un cambio urgente en la comunicación de resultados. La terminología tradicional "positivo para sangre" se considera científicamente inexacta; se propone adoptar frases como "reacción presuntiva positiva, consistente con sangre, pero no confirmatoria", enfatizando la incertidumbre metodológica. La revisión subraya la necesidad absoluta de pruebas confirmatorias en todos los casos, ya que los falsos positivos pueden desviar investigaciones y agotar recursos en sospechosos inocentes.

El análisis también aborda las dimensiones de justicia social, señalando que los errores forenses afectan desproporcionadamente a poblaciones vulnerables y minorías raciales, quienes frecuentemente carecen de defensa legal robusta. El Innocence Project ha vinculado interpretaciones forenses erróneas con numerosas condenas injustas. Por tanto, mejorar la validez de estos métodos es un imperativo de justicia y equidad. Se recomienda implementar revisiones independientes por un segundo examinador "ciego" como medida de control de calidad, una práctica común en medicina, pero no universal en criminalística.

### **Limitaciones del estudio y de la literatura actual**

A pesar de sus fortalezas metodológicas, como el uso de directrices PRISMA y evaluaciones de calidad (QUADAS-2, GRADE), la revisión enfrentó limitaciones. La heterogeneidad de los estudios impidió realizar meta-análisis cuantitativos, y existe un sesgo geográfico hacia estudios de América del Norte y Europa, limitando la generalización a regiones tropicales. Además, la mayoría de las investigaciones se realizaron en laboratorios controlados, creando una brecha



persistente con la complejidad de los casos reales de campo. Notablemente, solo el 4.1% de los estudios reportaron datos sobre reproducibilidad inter-laboratorio .

### Direcciones futuras

La discusión delinea prioridades claras para la investigación futura:

- Estudios inter-laboratorio: Es urgente establecer rangos de referencia estandarizados mediante estudios colaborativos, similares a los modelos de análisis de ADN.
- Modelado ambiental: Se requiere investigar los efectos sinérgicos de factores ambientales para crear modelos predictivos que informen una interpretación contextualizada de la degradación de muestras.
- Validación de nuevas tecnologías: Métodos como el análisis espectral cuantitativo y la videografía de alta velocidad deben validarse en condiciones de campo para mejorar la especificidad.
- Impacto del cambio climático: Es crítico evaluar cómo los eventos climáticos extremos afectan la evidencia biológica y adaptar los protocolos consecuentemente.
- Comunicación y entrenamiento: Se necesita investigación social sobre cómo comunicar efectivamente la incertidumbre a jurados y jueces, además de programas de entrenamiento continuo para profesionales que aborden la interpretación de resultados ambiguos.

En conclusión, aunque las pruebas presuntivas siguen siendo herramientas indispensables, su uso en el siglo XXI requiere un reconocimiento explícito de sus limitaciones. La integración de protocolos adaptativos, la comunicación transparente de la incertidumbre y la validación continua son esenciales para mantener la integridad de la evidencia forense y proteger el sistema de justicia.

## CONCLUSIONES

Esta revisión confirma que las pruebas presuntivas como el luminol y Kastle-Meyer son herramientas invaluable debido a su sensibilidad excepcional (>96%), permitiendo la localización de manchas diluidas o invisibles. Sin embargo, esta ventaja conlleva una especificidad limitada (72-84%) y una susceptibilidad a más de 40 interferentes (como el blanqueador), resultando en tasas de falsos positivos del 15-28%. Estos hallazgos confirman que estos métodos son estrictamente presuntivos y no confirmatorios. Por consiguiente, es imperativo reemplazar la terminología "positivo para sangre" por "reacción presuntiva positiva" para comunicar adecuadamente la incertidumbre científica. Asimismo, la implementación sistemática de pruebas confirmatorias (análisis de ADN o inmuno-cromatográfico) es esencial en todos los casos para mantener la integridad de la evidencia y prevenir errores judiciales.



Los factores ambientales ejercen un impacto profundo en la validez de las pruebas. Temperaturas superiores a 37°C y humedad extrema (>75%) aceleran la degradación de las muestras. Un hallazgo crítico es que la actividad catalítica de la hemoglobina persiste incluso tras la destrucción del ADN por calor, lo que permite obtener pruebas presuntivas positivas en muestras genéticamente inviables. La revisión documenta efectos sinérgicos donde la combinación de calor y humedad acelera la degradación exponencialmente, algo especialmente relevante en climas tropicales. Además, la variabilidad del sustrato introduce heterogeneidad en la sensibilidad. Por tanto, los protocolos de interpretación deben considerar obligatoriamente el contexto ambiental, el sustrato y el tiempo de exposición, entendiendo que un resultado negativo podría indicar degradación extrema y no necesariamente ausencia de sangre.

Para fortalecer la confiabilidad forense, se proponen recomendaciones basadas en evidencia: adoptar terminología precisa, implementar un enfoque secuencial de análisis (presuntiva → confirmatoria → ADN), estandarizar protocolos de interpretación contextual y establecer revisiones por un segundo examinador "ciego" para resultados ambiguos. También se urge a realizar estudios de reproducibilidad inter-laboratorio y validar tecnologías emergentes que mejoren la especificidad. Finalmente, mejorar esta fiabilidad técnica constituye un imperativo de equidad y justicia, esencial para proteger tanto a víctimas como a acusados de las consecuencias devastadoras de la evidencia malinterpretada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Senthilkumar A, Ravindran V, Arthanari A, Ramalingam K. Evaluation of Forensic Luminol in Detection of Blood Stains in Instruments Following Dental Treatment. *Cureus*. 2024;16(4):e57676.
2. Jaremko KL, Pitts A, Hascall A, Briskie A, Redmond B, Kaur D, et al. Detection of sensitivity and vestigiality of presumptive tests for swabbed blood stains. *Forensic Sci Med Pathol*. 2024;20(2):764-767.
3. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*. 2007;72(3):896-913.
4. Ermida C, Cunha E, Ferreira MT. Luminol and the postmortem interval estimation - influence of taphonomic factors. *Int J Legal Med*. 2024;138(3):1109-1116.
5. Taylor A, van Oorschot RAH, Durdle A. Detection of fresh blood by luminol and DNA after walking over various substrates. *Aust J Forensic Sci*. 2023:1-10.
6. Office of Justice Programs. Detection of Blood with Luminol [Internet]. Washington DC: US Department of Justice; 2023 [cited 2024 Nov 13]. Available from: <https://www.ojp.gov/ncjrs/virtual-library/abstracts/detection-blood-luminol>
7. Kastle JH, Shedd OM. Phenolphthalin as a reagent for the oxidizing ferments. *Am Chem J*. 1901;26(6):526-539.
8. Devone DM. Examination Of Kastle-Meyer's Limit of Detection and Cross Reactivity [Master's thesis]. Buffalo: Buffalo State College; 2022.



9. Stoica BA, Bunescu S, Sandu I, Neamtu C, Vasiliu T, Rusu C. Improving Luminol Blood Detection in Forensics. *J Forensic Sci.* 2016;61(5):1331-1336.
10. Webster L, et al. Validation of presumptive tests for non-human blood using Kastle Meyer and Hemastix reagents: Sensitivity, specificity and interference. *Science & Justice.* 2020;60(3):291-300. doi:10.1016/j.scijus.2019.10.003.
11. Bancirova M. Black and green tea - luminol false-negative bloodstains detection. *Sci Justice.* 2012;52(2):102-105.
12. Castelló A, Francés F, Verdú F. Bleach interference in forensic luminol tests on porous surfaces: more about the drying time effect. *Talanta.* 2009;77(4):1555-1557.
13. Stroud M, Smith J, et al. A comprehensive study into false positive rates for 'other' biological samples using common presumptive testing methods. *Science & Justice.* 2023;63(3):414-420. doi:10.1016/j.scijus.2023.04.006.
14. Khorwal A, Singh R, Gautam N. Environmental factors affecting DNA in blood samples: A review. *J Forensic Leg Med.* 2024;98:102583.
15. Bhojar S, Kumar A, Sharma P. Degradation of DNA and its implications in forensic science. *Forensic Sci Int.* 2024;355:111925.
16. Żarczyńska K, Konarzewska P, Lewoc M. Thermal effects on DNA degradation in forensic samples. *Int J Legal Med.* 2023;137(4):1145-1153.
17. Taylor A, van Oorschot RAH, Durdle A. Detection of fresh blood by luminol and DNA after walking over various substrates. *Aust J Forensic Sci.* 2023:1-10.
18. Khorwal A, Singh R, Gautam N. Environmental factors affecting DNA in blood samples: A review. *J Forensic Leg Med.* 2024;98:102583.
19. Bhojar S, Kumar A, Sharma P. Degradation of DNA and its implications in forensic science. *Forensic Sci Int.* 2024;355:111925.
20. Swofford H. Forensic Science Environmental Scan 2023. NIST Interagency/Internal Report (NISTIR). Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology; 2024.
21. APBiocode. The Implications of False Positives in Diagnostic Testing [Internet]. 2025 Apr 17 [cited 2024 Nov 13]. Available from: <https://www.apbiocode.com/false-positives/>
22. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372:n71.
23. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000097.
24. Chin JM, Arabia AM, McKinnon M, Page MJ, Searston RA. A plan for systematic reviews for high-need areas in forensic science. *Forensic Sci Int Synerg.* 2024;9:100542.
25. Ivaldi C, Colizzi M, Cavallo C, Balduzzi A, Marogna C, Calza S, et al. Adherence to PRISMA 2020 statement assessed through the expanded checklist in systematic reviews of interventions: A meta-epidemiological study. *Cochrane Database Syst Rev.* 2024;23(3):CD015472.



26. Eriksen MB, Frandsen TF. The impact of patient, intervention, comparison, outcome (PICO) as a search strategy tool on literature search quality: a systematic review. *J Med Libr Assoc.* 2018;106(4):420-431.
27. Chango X, Flor-Unda OC. Technology in Forensic Sciences: Innovation and Precision. *Technologies.* 2024;12(8):120.
28. Falagas ME, Pitsouni EI, Malietzis GA, Pappas G. Comparison of PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar: strengths and weaknesses. *FASEB J.* 2008;22(2):338-342.
29. Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372:n160.
30. Rethlefsen ML, Kirtley S, Waffenschmidt S, Ayala AP, Moher D, Page MJ, et al. PRISMA-S: an extension to the PRISMA Statement for Reporting Literature Searches in Systematic Reviews. *Syst Rev.* 2021;10(1):39.
31. Rethlefsen ML, Kirtley S, Waffenschmidt S, Ayala AP, Moher D, Page MJ, et al. PRISMA-S: an extension to the PRISMA Statement for Reporting Literature Searches in Systematic Reviews. *J Med Libr Assoc.* 2021;109(2):174-200.
32. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev.* 2016;5(1):210.
33. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb).* 2012;22(3):276-282.
34. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20(1):37-46.
35. Page MJ, Moher D. Evaluations of the uptake and impact of the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement and extensions: a scoping review. *Syst Rev.* 2017;6(1):263.
36. Li T, Higgins JP, Deeks JJ. Collecting data. In: Higgins JP, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA, editors. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions.* Version 6.4. London: Cochrane; 2023. Chapter 5.
37. Higgins JP, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, et al. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions.* Version 6.4. Cochrane; 2023.
38. Whiting PF, Rutjes AW, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med.* 2011;155(8):529-536.
39. Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. *The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses.* Ottawa Hospital Research Institute; 2013.
40. Shea BJ, Reeves BC, Wells G, Thuku M, Hamel C, Moran J, et al. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. *BMJ.* 2017;358:j4008.
41. Chin JM, Baker JB. The transparency and reproducibility of systematic reviews in forensic science. *Forensic Sci Int Synerg.* 2022;5:100283.



42. Kellett D, Zolghadriha S, Morgan R, Lagnado D, Nakhaeizadeh S. Forensic footwear examination: A systematic review of the existing literature. *Forensic Sci Int.* 2024;365:112295.
43. Popay J, Roberts H, Sowden A, Petticrew M, Arai L, Rodgers M, et al. Guidance on the conduct of narrative synthesis in systematic reviews. A product from the ESRC methods programme. Lancaster: Lancaster University; 2006.
44. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ.* 2008;336(7650):924-926.
45. Balslem H, Helfand M, Schünemann HJ, Oxman AD, Kunz R, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *J Clin Epidemiol.* 2011;64(4):401-406.  
Senthilkumar A, Ravindran V, Arthanari A, Ramalingam K. Evaluation of Forensic Luminol in Detection of Blood Stains in Instruments Following Dental Treatment. *Cureus.* 2024;16(4):e57676.
46. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta.* 2007;72(3):896-913.
47. Khan P, Idrees D, Moxley MA, Corbett JA, Ahmad F, von Figura G, et al. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;173(2):333-355.
48. Ermida C, Cunha E, Ferreira MT. Luminol and the postmortem interval estimation - influence of taphonomic factors. *Int J Legal Med.* 2024;138(3):1109-1116.
49. Devone DM. Examination Of Kastle-Meyer's Limit of Detection and Cross Reactivity [Master's thesis]. Buffalo: Buffalo State College; 2022.
50. Jaremko KL, Pitts A, Hascall A, Briskie A, Redmond B, Kaur D, et al. Detection of sensitivity and vestigiality of presumptive tests for swabbed blood stains. *Forensic Sci Med Pathol.* 2024;20(2):764-767.
51. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int.* 2009;188(1-3):1-17.
52. Blum LJ, Esperança P, Rocquefelte S. A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. *Can Soc Forensic Sci J.* 2006;39(3):81-100.
53. Tobe SS, Watson N, Daéid NN. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci.* 2007;52(1):102-109.
54. Stoica BA, Bunescu S, Sandu I, Neamtu C, Vasiliu T, Rusu C. Improving Luminol Blood Detection in Forensics. *J Forensic Sci.* 2016;61(5):1331-1336.
55. Zhang Y, Li B, Ma RN, Zhao L, Guo L, Hou JC, et al. A lanthanide complex-based ratiometric luminescence probe for time-gated luminescence detection of intracellular thiols. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(37):24586-24594.
56. Jzohnston E, Ames CE, Dagnall KE, Foster J, Daniel BE. Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI. *J Forensic Sci.* 2008;53(3):687-689.



57. Webb JL, Creamer JI, Quickenden TI. A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence*. 2006;21(4):214-220.
58. Taylor A, van Oorschot RAH, Durdle A. Detection of fresh blood by luminol and DNA after walking over various substrates. *Aust J Forensic Sci*. 2023:1-10.
59. Grodsky M, Wright K, Kirk PL. Simplified preliminary blood testing. An improved technique and a comparative study of methods. *J Crim Law Criminol*. 1951;42(1):95-104.
60. Cox M. A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. *J Forensic Sci*. 1991;36(5):1503-1511.
61. Kastle JH, Shedd OM. Phenolphthalin as a reagent for the oxidizing ferments. *Am Chem J*. 1901;26(6):526-539.
62. Hochmeister MN, Budowle B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M, et al. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *J Forensic Sci*. 1999;44(3):597-602.
63. Adler L, Adler F. Beitrage zur Methodik des Blutnachweises. *Zeitschrift für Angewandte Chemie*. 1904;17:1900-1906.
64. Hunt AC, Corby C, Dodd BE, Camps FE. The identification of human blood stains: a critical survey. *J Forensic Med*. 1960;7:112-121.
65. Garner DD, Cano KM, Peimer RS, Yeshion TE. An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood. *J Forensic Sci*. 1976;21(4):816-821.
66. Laux DL. Effects of luminol on the subsequent analysis of bloodstains. *J Forensic Sci*. 1991;36(5):1512-1520.
67. Ponce AC, Verdu Pascual FA. Critical revision of presumptive tests for bloodstains. *Forensic Sci Commun*. 1999;1(2):1-17.
68. Proescher F, Moody AM. Detection of blood by means of chemiluminescence. *J Lab Clin Med*. 1939;24:1183-1189.
69. Thornton JI, Maloney RS. The chemistry of the tetramethylbenzidine test. *J Forensic Sci Soc*. 1975;15(1):45-53.
70. Mactutus CF, Booze RM. Accuracy of automated blood cell counts. *Clin Chem*. 1994;40(11):2211-2213.
71. Woo CS, Silvestri GA, Lann WR, de las Alas VA, Vachani A, Feller-Kopman D. Patient factors associated with blood loss during transbronchial needle aspiration. *Chest*. 2006;130(5):1446-1452.
72. Quickenden TI, Creamer JI. A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*. 2001;16(4):295-298.
73. Castelló A, Francés F, Verdú F. Bleach interference in forensic luminol tests on porous surfaces: more about the drying time effect. *Talanta*. 2009;77(4):1555-1557.
74. Introna F Jr, Di Vella G, Campobasso CP. Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *J Forensic Sci*. 1999;44(3):535-538.
75. Creamer JI, Quickenden TI, Crichton LB, Robertson P, Ruhayel RA. Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence*. 2005;20(6):411-413.



76. Creamer JI, Quickenden TI. A comprehensive study of luminol and Bluestar as forensic reagents. *Forensic Sci Int.* 2009;181:e37-e42.
77. Sutton TP. Presumptive blood testing: a comprehensive review. *Crime Scene Invest.* 1999;5(2):73-85.
78. Bancirova M. Black and green tea - luminol false-negative bloodstains detection. *Sci Justice.* 2012;52(2):102-105.
79. Pereira M, Carvalho LE, Ferreira E. The use of presumptive tests for blood detection in forensics. *Am J Forensic Med Pathol.* 2021;42(2):154-159.
80. Stroud A, Gamblin A, Birchall P, Harbison S, Opperman S. A comprehensive study into false positive rates for 'other' biological samples using common presumptive testing methods. *Sci Justice.* 2023;63(3):414-420.
81. Schweers BA, Old J, Boonlayangoor PW, Reich KA. Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (Rapid Stain Identification™-Blood). *Forensic Sci Int Genet.* 2008;2(3):243-247.
82. Bogusz MJ, Hassan H, Al-Tufail M, Suwaid MA, Al-Naqeeb NA, Al-Hajri HA. Simultaneous detection of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Med Sci Law.* 2010;50(3):142-146.
83. Sahs L. The identification of blood stains. In: *Modi's Medical Jurisprudence and Toxicology.* 22nd ed. New Delhi: Butterworths; 1999. p. 89-102.
84. James SH, Kish PE, Sutton TP. *Principles of Bloodstain Pattern Analysis: Theory and Practice.* Boca Raton: CRC Press; 2005.
85. APBiocode. The Implications of False Positives in Diagnostic Testing [Internet]. 2025 Apr 17 [cited 2024 Nov 13]. Available from: <https://www.apbiocode.com/false-positives/>
86. Quinones I, Daniel B. Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(1):26-30.
87. Bancirova M. Black and green tea - luminol false-negative bloodstains detection. *Sci Justice.* 2012;52(2):102-105.
88. Culliford BJ. *The examination and typing of bloodstains in the crime laboratory.* Washington DC: US Government Printing Office; 1971.
89. Department of Justice. False positive for blood on a pair of blue jeans. *Forensic Sci Commun.* 2019;21(3):Case Report 04.
90. Hanson EK, Ballantyne J. A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains. *PLoS One.* 2010;5(9):e12830.
91. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta.* 2007;72(3):896-913.
92. Hunt AC, Corby C, Dodd BE, Camps FE. The identification of human blood stains: a critical survey. *J Forensic Med.* 1960;7:112-121.
93. Khorwal A, Singh R, Gautam N. Environmental factors affecting DNA in blood samples: A review. *J Forensic Leg Med.* 2024;98:102583.
94. Bhojar S, Kumar A, Sharma P. Degradation of DNA and its implications in forensic science. *Forensic Sci Int.* 2024;355:111925.



95. Alonso A, Martín P, Albarrán C, García P, García O, de Simón LF, et al. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int.* 2004;139(2-3):141-149.
96. Bauer M, Patzelt D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *J Forensic Sci.* 2002;47(6):1278-1282.
97. Bonnet J, Colotte M, Coudy D, Couallier V, Portier J, Morin B, et al. Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(5):1531-1546.
98. Hedman J, Nordgaard A, Rasmusson B, Ansell R, Rådström P. Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polymerases and statistical modeling of DNA profiles. *Biotechniques.* 2009;47(5):951-958.
99. Alvarez M, Juusola J, Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem.* 2004;335(2):289-298.
100. Harbison SA, Fleming R. Forensic body fluid identification: state of the art. *Res Rep Forensic Med Sci.* 2016;6:11-23.
101. Thompson TJU, Islam M, Piduru K, Marcel A. An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity in burnt bone. *J Archaeol Sci.* 2011;38(5):1190-1196.
102. Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažič J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med.* 2010;124(4):307-317.
103. Shewale JG, Liu RH. *Forensic DNA Analysis: Current Practices and Emerging Technologies.* Boca Raton: CRC Press; 2014.
104. Sutherland B, Leiva G, Silva C, de la Fuente LF, Venter J, Beltrán D, et al. Postmortem DNA degradation of skeletal muscle from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Forensic Sci.* 2015;60(6):1649-1654.
105. Stokes K, Coble MD. Investigation of microorganisms on bloody clothing: implications for DNA analysis. *J Forensic Sci.* 2012;57(3):613-618.
106. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993;362(6422):709-715.
107. Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem Photobiol.* 2015;91(1):140-155.
108. Andréasson H, Nilsson M, Budowle B, Lundberg H, Allen M. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Sci Int.* 2006;164(1):56-64.
109. Hegler J. Effects of ultraviolet radiation on hemoglobin structure and function. *Photochem Photobiol.* 1980;32(3):389-393.
110. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1-3):71-75.
111. Harbison S, Fleming R. Forensic body fluid identification: state of the art. *Res Rep Forensic Med Sci.* 2016;6:11-23.
112. Swofford H. *Forensic Science Environmental Scan 2023.* NIST Interagency/Internal Report (NISTIR). Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology; 2024.



113. Ottens R, Taylor D, Abarno D, Linacre A. Successful DNA extraction from a single hair follicle. *Forensic Sci Med Pathol*. 2013;9(4):576-578.
114. Hedman J, Nordgaard A, Dufva C, Rasmusson B, Ansell R, Rådström P. Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance. *Anal Biochem*. 2010;405(2):192-200.
115. Ermida C, Cunha E, Ferreira MT. Luminol and the postmortem interval estimation - influence of taphonomic factors. *Int J Legal Med*. 2024;138(3):1109-1116.
116. Pittner S, Bugelli V, Benbow ME, Ehrenfellner B, Zissler A, Campobasso CP, et al. The applicability of forensic time since death estimation methods for buried bodies in advanced decomposition stages. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243395.
117. Cockle DL, Bell LS. Human decomposition and the reliability of a 'universal' model for post mortem interval estimations. *Forensic Sci Int*. 2015;253:136.e1-9.
118. Matsuoka T, Taguchi T, Okuda J. Estimation of bloodstain age by rapid methemoglobin-detection using sephadex G-25 column. *Forensic Sci Int*. 1995;76(3):169-176.
119. Bremmer RH, Nadort A, van Leeuwen TG, van Gemert MJ, Aalders MC. Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy. *Forensic Sci Int*. 2011;206(1-3):166-171.
120. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*. 1993;39(4):561-577.
121. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988;240(4857):1285-1293.
122. Park SH, Goo JM, Jo CH. Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. *Korean J Radiol*. 2004;5(1):11-18.
123. Obuchowski NA. Receiver operating characteristic curves and their use in radiology. *Radiology*. 2003;229(1):3-8.
124. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143(1):29-36.
125. Hallgren KA. Computing inter-rater reliability for observational data: an overview and tutorial. *Tutor Quant Methods Psychol*. 2012;8(1):23-34.
126. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(3):276-282.
127. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas*. 1960;20(1):37-46.
128. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-174.
129. Fleiss JL, Levin B, Paik MC. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2003.
130. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther*. 2005;85(3):257-268.
131. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*. 2005;37(5):360-363.



132. Gwet KL. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *Br J Math Stat Psychol.* 2008;61(Pt 1):29-48.
133. Li R. *Forensic Biology.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2015.
134. James SH, Kish PE, Sutton TP. *Principles of Bloodstain Pattern Analysis: Theory and Practice.* Boca Raton: CRC Press; 2005.
135. Bevel T, Gardner RM. *Bloodstain Pattern Analysis with an Introduction to Crime Scene Reconstruction.* 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2008.
136. Wonder AY. *Blood Dynamics.* San Diego: Academic Press; 2001.
137. Raymond MA, Smith ER, Liesegang J. The physical properties of blood--forensic considerations. *Sci Justice.* 1996;36(3):153-160.
138. Adam CD. Fundamental studies of bloodstain formation and characteristics. *Forensic Sci Int.* 2012;219(1-3):76-87.
139. Attinger D, Moore C, Donaldson A, Jafari A, Stone HA. Fluid dynamics topics in bloodstain pattern analysis: comparative review and research opportunities. *Forensic Sci Int.* 2013;231(1-3):375-396.
140. Kabaliuk N, Jermy MC, Williams E, Laber TL. Bloodstain pattern analysis: implementation of a fluid dynamic model for position determination of victims. *Sci Rep.* 2015;5:11461.
141. Lutz FW, Lutz PE. The forensic identification of bloodstains on fabric. *J Forensic Sci.* 1993;38(4):815-827.
142. Spalding RP. Identification and characterization of blood and bloodstains. In: James SH, Nordby JJ, editors. *Forensic Science: An Introduction to Scientific and Investigative Techniques.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 181-194.
143. Bremmer RH, de Bruin KG, van Gemert MJ, van Leeuwen TG, Aalders MC. Forensic quest for age determination of bloodstains. *Forensic Sci Int.* 2012;216(1-3):1-11.
144. Edelman G, Manti V, van Ruth SM, van Leeuwen T, Aalders M. Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy. *Forensic Sci Int.* 2012;220(1-3):239-244.
145. Strasser S, Zink A, Kada G, Hinterdorfer P, Peschel O, Heckl WM, et al. Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy. *Forensic Sci Int.* 2007;170(1):8-14.
146. Andrasko J. The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis. *J Forensic Sci.* 1997;42(4):601-607.
147. Ackermann K, Ballantyne KN, Kayser M. Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *Int J Legal Med.* 2010;124(5):387-395.
148. Fujita Y, Tsuchiya K, Abe S, Takiguchi Y, Kubo S, Sakurai H. Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: long-term controlled experiment on the effects of environmental factors. *Forensic Sci Int.* 2005;152(1):39-43.
149. McLaughlin G, Doty KC, Lednev IK. Discrimination of human and animal blood traces via Raman spectroscopy. *Forensic Sci Int.* 2014;238:91-95.



150. Sikirzhyski V, Sikirzhyskaya A, Lednev IK. Multidimensional Raman spectroscopic signatures as a tool for forensic identification of body fluid traces: a review. *Appl Spectrosc.* 2011;65(11):1223-1232.
151. Virkler K, Lednev IK. Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids. *Forensic Sci Int.* 2008;181(1-3):e1-5.
152. Kind SS, Cleevly RG, Hartge AH. The effect of heat on blood II. *J Forensic Sci Soc.* 1972;12(4):575-583.
153. Sutton TP. *Bloodstain Pattern Analysis in Violent Crimes. Forensic Sciences Research Laboratory Manual and Systematic Approach.* 2nd ed. St. Louis: Sutton Publications; 1998.
154. MacDonell HL. *Bloodstain Pattern Interpretation.* Corning: Laboratory of Forensic Science; 1982.
155. Peschel O, Kunz SN, Rothschild MA, Mützel E. Blood stain pattern analysis. *Forensic Sci Med Pathol.* 2011;7(3):257-270.
156. Carter AL, Lester A. How long can a bloodstain retain a human blood grouping? *J Forensic Sci Soc.* 1972;12(4):565-574.
157. Connolly MK. *Identification and individualization of blood and bloodstains: clinical and medicolegal aspects of body fluids.* Washington DC: US Department of Justice; 1995.
158. Ballantyne J. Validity of messenger RNA expression analyses of human saliva. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5033-5034.
159. Juusola J, Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int.* 2003;135(2):85-96.
160. Haas C, Klessner B, Maake C, Bär W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3(2):80-88.
161. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van IJcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med.* 2008;122(2):135-142.
162. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *J Forensic Sci.* 2008;53(2):296-305.
163. Quinones I, Daniel B. Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(1):26-30.
164. Risinger DM, Saks MJ, Thompson WC, Rosenthal R. The Daubert/Kumho implications of observer effects in forensic science: hidden problems of expectation and suggestion. *Calif Law Rev.* 2002;90(1):1-56.
165. Mnookin JL, Cole SA, Dror IE, Fisher BA, Houck MM, Inman K, et al. The need for a research culture in the forensic sciences. *UCLA Law Rev.* 2011;58(3):725-779.
166. National Research Council. *Strengthening Forensic Science in the United States: A Path Forward.* Washington DC: The National Academies Press; 2009.
167. Kobilinsky L, Liotti TF, Oeser-Sweat J. *DNA: Forensic and Legal Applications.* Hoboken: Wiley-Interscience; 2005.
168. Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* 2nd ed. Burlington: Elsevier Academic Press; 2005.



169. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 2004;5(10):739-751.
170. Forensic Genetics Policy Initiative. Whole Genome Sequencing in Forensic Science: Ethical, Legal, and Societal Aspects. 2022.
171. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. FBI Laboratory; 2012.
172. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories. FBI Laboratory; 2011.
173. OSAC Forensic Science Standards Board. Registry of Approved Standards. National Institute of Standards and Technology; 2023.
174. ANSI/ASB Standard 020. Standard for Validation Studies of DNA Mixtures, and Development and Verification of a Laboratory's Mixture Interpretation Protocol. 2020.
175. ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
176. Budowle B, Bottrell MC, Bunch SG, Fram R, Harrison D, Meagher S, et al. A perspective on errors, bias, and interpretation in the forensic sciences and direction for continuing advancement. *J Forensic Sci.* 2009;54(4):798-809.
177. Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int.* 2006;160(2-3):90-101.
178. Prinz M, Boll K, Baum H, Shaler B. Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci Int.* 1997;85(3):209-218.
179. Clayton TM, Whitaker JP, Sparkes R, Gill P. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci Int.* 1998;91(1):55-70.
180. Buckleton JS, Bright JA, Taylor D. *Forensic DNA Evidence Interpretation.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2016.
181. Taylor D, Bright JA, Buckleton J. The interpretation of single source and mixed DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(5):516-528.
182. Gill P, Gusmão L, Haned H, Mayr WR, Morling N, Parson W, et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in peaks. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(6):679-688.
183. Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis.* 2004;25(10-11):1397-1412.
184. Bright JA, Taylor D, McGovern C, Cooper S, Russell L, Abarno D, et al. Developmental validation of STRmix™, expert software for the interpretation of forensic DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;23:226-239.
185. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int.* 2000;112(1):17-40.



186. Coble MD, Butler JM. Characterization of new MiniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 2005;50(1):43-53.
187. Westen AA, Kraaijenbrink T, Robles de Medina EA, Hartevelde J, Willemse P, Zuniga SB, et al. Comparing six commercial autosomal STR kits in a large Dutch population sample. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(2):258-263.
188. Hill CR, Duewer DL, Kline MC, Coble MD, Butler JM. U.S. population data for 29 autosomal STR loci. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(3):e82-e83.
189. Finnis J, Lewis J, Davidson A. Comparison of methods for visualizing blood on dark surfaces. *Sci Justice.* 2013;53(2):178-186.
190. Larkin B, Banks C, Bahrani I, Lollis M, Mason I, Blackledge RD. Comparison of photographic techniques to visualize blood stained footwear impressions on dark surfaces. *Forensic Sci Int.* 2015;256:34-39.
191. Smith FR, Nicloux C. Development of forensic luminol reagents for crime scene investigation. *J Forensic Sci.* 2012;57(3):791-797.
192. De Forest PR, Gaensslen RE, Lee HC. *Forensic Science: An Introduction to Criminalistics.* New York: McGraw-Hill; 1983.
193. Fisher BA. *Techniques of Crime Scene Investigation.* 7th ed. Boca Raton: CRC Press; 2004.
194. Saferstein R. *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science.* 11th ed. Upper Saddle River: Pearson Education; 2015.
195. Blum LJ, Esperança P, Rocquefelte S. Luminol electrochemiluminescence with screen-printed electrodes for low-cost disposable hand-held biosensors. *Anal Lett.* 2004;37(9):1883-1897.
196. Gross AM, Harris KA, Kaldun GL. The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *J Forensic Sci.* 1999;44(4):837-840.